

REVISIÓN DE LITERATURA

Aspectos inmunopatológicos de la neosporosis bovina

Immunopathologic aspects of bovine neosporosis

RONDÓN-BARRAGÁN, I.S.¹; BRAGAGNINI DÍAZ, H.E.²

¹Est. Med. Vet. Zootec. iangrondon@gmail.com Universidad de los Llanos

²Est. Med. Vet. Zootec. Grupo de Investigación en Reproducción y Genética Animal – GIRGA. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de los Llanos hbragagnini@yahoo.com.ar

Recibido Marzo 17 de 2006 . Aprobado Junio 16 de 2006

RESUMEN

Neospora caninum es un protozooario coccidial, filum *Apicomplexa*, familia *Sarcocystidae*, de distribución mundial y uno de los principales agentes causales de aborto bovino. *N. caninum* infecta rumiantes, equinos y cánidos silvestres como hospederos intermediarios y se ha determinado el perro como hospedero definitivo. Aunque ha sido considerado como un género y especie definido, su biología es escasamente conocida. La respuesta inmune contra la infección por *N. caninum* se caracteriza por la secreción de interferón α (IFN α), factor de necrosis tumoral α (TNF α) e interleuquina 2 (IL-2) por linfocitos T CD4⁺. En hembras gestantes la infección con *N. caninum* puede desencadenar aborto así como el nacimiento de terneros débiles o clínicamente sanos pero persistentemente infectados. Durante la gestación los parásitos se reactivan, diseminan e invaden los tejidos placentarios y fetales, causando destrucción de las vellosidades placentarias y aborto. La infección adquirida por la madre en el primer trimestre de gestación desencadena la liberación

de citoquinas (IL-12, IFN- α y TNF α) de células T ayudadoras tipo 1 (Th1) y una subsecuente producción de radicales libres. Posterior al primer trimestre de gestación, la respuesta inmune Th1 vira a Th2 acompañada de la secreción de IL-4 y IL-5, las cuales son menos eficaces en el control de la infección, disminuyendo el riesgo de aborto pero conllevando a una infección congénita. La implementación de herramientas moleculares para el desarrollo de estudios epidemiológicos más confiables que determinen la incidencia e impacto real de *N. caninum* en Colombia y la posterior identificación de los blancos moleculares de la infección para el establecimiento de medidas inmunoprolifáticas se proponen como las estrategias de control más viables.

Palabras clave: *Neospora caninum*, bovinos, inmunopatología, linfocitos T CD4⁺, interferón α , aborto.

ABSTRACT

Neospora caninum is a coccidian protozoan, phylum *Apicomplexa*, family *Sarcocystidae*, of worldwide distribution and one of bovine abortion-causing agents. *N. caninum* infects ruminants, equines and wild canids as intermediary hosts, and the dog was determined as definitive host. Although has been considered belonging to defined genus and species, its biology is scarcely known. Immune response against *N. caninum* infection is characterized by the secretion of interferon α (IFN α), tumor necrosis factor α (TNF α) and interleukin 2 (IL-2) from T CD4⁺ lymphocytes. In pregnant females,

N. caninum infection can lead to abortion as well as born of weak or clinically healthy but persistently infected calves. During gestation, the parasites reactivate, spread and invade placental and foetal tissues; causing placental villi destruction and abortion. Acquired infection by the dam in first trimester of pregnancy lead to cytokine release (IL-12, IFN- α y TNF α) produced by T helper cell type-1 (Th1) and subsequent production of free radicals. Later of the first trimester of gestation, immune response Th1-type turns on Th2-type accompanied of release of IL-4, IL-5 which are

less effective to control the infection, diminishing the risk of abortion but lead to congenital infection. The implementation of molecular tools for the development of more reliable epidemiologic surveys that determine the incidence and real impact of *N. caninum* in Colombia and the later identification of molecular targets

of infection for the establishment of immunoprophylactic measures are proposed as more viable control strategies.

Keywords: *Neospora caninum*, bovinos, inmunopatología, T CD4⁺ lymphocytes, interferon α , abortion.

INTRODUCCIÓN

Neospora caninum es un protozooario coccidial, filum *Apicomplexa*, familia *Sarcocystidae*, de distribución mundial (Quintanilla-Gozalo *et al.*, 1999; Gondim *et al.*, 1999; Suteeraparp *et al.*, 1999; Osawa *et al.*, 2002; García-Vázquez *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2003; Václavek *et al.*, 2003; Sadrebazazz *et al.*, 2004; Koiwai *et al.*, 2005), identificado por primera vez en un caso de encefalitis y miocarditis en un canino (Bjerkås *et al.*, 1984) y posteriormente aislado del cerebro de un cachorro, el cual desarrolló parálisis de las extremidades posteriores (Dubey *et al.*, 1988a; Dubey *et al.*, 1988b). En 1989, se encontró *Neospora caninum* en un foco de necrosis cerebral en dos fetos bovinos abortados en Nuevo México (Thilsted & Dubey, 1989). A partir de la década del 90 se consideró a *N. caninum* como una de las principales causas de aborto en bovinos (Anderson *et al.*, 1991), así como el agente responsable de nacimientos de terneros con signos neurológicos (Dubey *et al.*, 1990) sin conocer aún los factores predisponentes (Thornton *et al.*, 1991).

N. caninum infecta rumiantes, equinos y cánidos silvestres como hospedadores intermediarios; y se ha determinado el perro como hospedero definitivo (McAllister *et al.*, 1998); aun así, *N. caninum* puede reproducirse asexualmente por un periodo de tiempo prolongado, por lo cual un clon podría persistir por largo tiempo en la misma población del hospedero sin requerir un hospedador definitivo (Pérez-Zaballos *et al.*, 2005). Pérez-Zaballos *et al.* (2005) sugieren que *N. caninum* es capaz de evolucionar rápidamente bajo nuevas condiciones ambientales en ausencia de recombinación sexual, esto favorecido por las mutaciones que le confieren alguna ventaja favorecida por la selección natural.

Aunque Dubey *et al.* (1998) lo consideraron como un género y especie definido, otros autores (Mehlhorn & Heydorn, 2000; Heydorn & Mehlhorn, 2002) argumentan que *N. caninum* no abarca los requisitos formales de las reglas internacionales de nomenclatura zoológica.

INMUNOPATOGENESIS: Relación hospedero-parásito

La patogénesis del *N. caninum* se debe a la multiplicación de los parásitos que conlleva a la destrucción de diversos tipos de células del hospedero

(Uchida *et al.*, 2004). En hospederos inmunocompetentes, la infección es rápidamente controlada por la respuesta inmune, y guía a un estado de conversión de taquizoito a bradizoito, durante el cual los bradizoitos forman quistes tisulares que lo protegen de las reacciones inmunológicas y fisiológicas por parte del hospedero (Alaedine *et al.*, 2005).

Alaedine *et al.* (2005) indicaron que seguido a la infección experimental en ratones, los taquizoitos se diseminan en diversos órganos y causan una falla multiorgánica en aquellos casos en los cuales el sistema inmune no es capaz de generar una respuesta limitante de la infección. Aun así, en animales inmunocompetentes en los cuales los taquizoitos fueron eliminados, estos persistieron en el sistema nervioso central.

Respuesta inmune a *N. caninum* en animales no gestantes

La respuesta inmune frente a *N. caninum* se caracteriza por ser mediada por células (debido a su carácter intracelular obligatorio) y la liberación de citoquinas - i.e. Interferón α ; factor de necrosis tumoral alfa e interleuquina 2- por linfocitos T CD4⁺ (Innes *et al.*, 2002; Innes *et al.*, 2005).

Aunque se ha determinado que la actividad del interferón gamma (IFN- γ) es independiente de óxido nítrico (Yamane *et al.*, 2000), Tanaka *et al.* (2000a) demostraron la importancia del óxido nítrico en la resistencia en ratones a la infección con *N. caninum*: ratones deficientes en la producción de óxido nítrico sintasa (iNOS) son más susceptibles a la infección por *N. caninum*, que los ratones sin dicha deficiencia. Algunos autores argumentan que dicho efecto se puede presentar, al igual que en *Toxoplasma*, debido a una depleción de triptófano (Naginei *et al.*, 1996 citado por Yamane *et al.*, 2000) o especies reactivas de oxígeno (Murray *et al.*, 1979) aun cuando otras hipótesis los contradicen (Woodman *et al.*, 1991; Halonen *et al.*, 1998 citado por Yamane *et al.*, 2000).

Nishikawa *et al.* (2001) determinaron que el IFN- α controla la proliferación de *N. caninum* dentro del hospedero, gracias a la activación de macrófagos y

respuestas dependientes de células T CD4⁺ y que la sobrevivencia del hospedero es dependiente de la sobreexpresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II.

En trabajos realizados por Tanaka *et al.* (2000b) ratones con depleción de células T CD4⁺ mostraron una tasa de mortalidad alta comparados con ratones con depleción de células T CD8⁺ o los control, lo cual demostró la importancia de los linfocitos T efectores en la resistencia a la infección. Estos autores postulan dos direcciones de la respuesta inmune, la primera adscrita al papel del IFN- γ producido por células T al activar las células del hospedero (macrófagos, etc.) las cuales destruyen directamente los parásitos intracelulares. Y una segunda, en las cuales las células T CD4⁺ activadas por el IFN- γ se diferencian a células Th1 o de tipo citotóxico en un estadio temprano de la infección. Además el tipo Th1 de las células T CD4⁺ produce algunos factores que activan otras células y respuestas por parte de células T CD4⁺ citotóxicas que directamente eliminan las células infectadas con el parásito. En el estado tardío de la infección, las células T CD4⁺ ayudan en la producción de anticuerpos contra *N. caninum* al inducir otros mecanismos protectores (citotoxicidad dependiente de anticuerpo, opsonización, etc., Tanaka *et al.*, 2000b).

Rettigner *et al.* (2004) encontraron una respuesta linfoproliferativa altamente específica en ratones inmunocompetentes 8 semanas después de la infección primaria, acompañada de un patrón mixto de secreción de citoquinas, caracterizado por altos niveles de IFN- γ y niveles bajos de IL-4 e IL-10. Este comportamiento se evidencia gracias al antagonismo que presentan la IL-4 y el IFN- γ (Tizard, 2002). Por otra parte, Lunden *et al.* (2002) demostraron que la resistencia contra la neosporosis en ratones BALB/c inmunizados está relacionada con la secreción de IFN- γ y que la protección contra *N. caninum* es observada en presencia de niveles elevados de IL-4 y IL-5. La IL-4 constituye un factor importante en la respuesta inmune frente a la infección por *N. caninum*, pues es capaz de antagonizar los efectos de la activación de macrófagos causados por el IFN- γ (Orrego, 2004), disminuyendo el daño local debido a la acción de enzimas liberadas por macrófagos. La liberación de IL-4 estimula el multiplicación y diferenciación de linfocitos B activados, e intensifica la expresión de MHC clase II y receptores Fc (Tizard, 2002), facilitando la presentación de antígenos y la opsonización, respectivamente.

Moore *et al.* (2005) demostraron que aunque los niveles inducidos de anticuerpos específicos y de IFN- γ en ganado inmunizado son similares a aquellos observados en ganado infectado naturalmente, diferentes vías inmunes pueden ser desencadenadas con diferentes grados de inmunidad protectora para cada uno.

Por otro lado, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) es capaz, en menor medida, de inhibir el crecimiento de taquizoitos de *N. caninum* probablemente por inducir la producción de especies reactivas de oxígeno (Yamane *et al.*, 2000).

Respuesta inmune a *N. caninum* en animales gestantes

La infección de animales gestantes puede guiar a aborto del feto o embrión así como al nacimiento de terneros débiles o clínicamente sanos pero persistentemente infectados (Aleadine *et al.*, 2005).

Durante la gestación los parásitos se reactivan, diseminan e invaden los tejidos placentarios, fetales, o ambos (Aleadine *et al.*, 2005), causando destrucción de las células septales y degeneración aguda de las vellosidades placentales fetales, asociadas a un daño vascular y desencadenando aborto (Maley *et al.*, 2003). La respuesta inmune del hospedero en la placenta puede ser lesiva para el feto. Las citoquinas proinflamatorias tales como el IFN- γ , IL-2 o el TNF- α , usualmente ausentes en la placenta pueden, en bajas concentraciones, desencadenar una respuesta a la infección (Andrianarivo *et al.*, 2005). Por tanto el aborto es causado por una destrucción masiva de los tejidos placentarios; desencadenada por la respuesta inmune de la madre y el feto (Andrianarivo *et al.*, 2005). La probabilidad de aborto en ganado infectado crónicamente es mas alta a la primera preñez, y es reducida en preñeces subsecuentes (Aleadine *et al.*, 2005), evidenciando la generación de inmunidad adquirida.

Entre las semanas 10-15 de gestación, se presenta una subregulación de la respuesta inmune mediada por células (*i.e.* disminución aguda en la proliferación de monocitos periféricos sanguíneos y baja producción de IFN- γ), concomitante con un incremento en la producción de IgG₁, sugiriendo una respuesta inmune tipo 2 (Andrianarivo *et al.*, 2005), esta respuesta tipo 2 puede reactivar la infección latente (Innes *et al.*, 2002; Figura 1). Sin embargo, en animales infectados con *N. caninum* no se evidencia alteración de la función normal de los linfocitos T (Andrianarivo *et al.*, 2005).

Quinn *et al.* (2002) argumentan que en la neosporosis bovina, la infección adquirida de la madre en el primer trimestre puede inducir repuestas de citoquinas de células T ayudadoras tipo 1 (Th1) guiando a la generación de IL-12, IFN- γ y TNF- α y una subsecuente producción de radicales libres de oxígeno tales como el óxido nítrico, los cuales pueden ser letales para el parásito pero también para el feto. Como la preñez progresa, las respuestas de citoquinas Th1 pueden virar hacia Th2. De esta manera, si la infección parasitaria es adquirida en el tercer trimestre, son generadas

citoquinas tales como IL-4 e IL-5, estas eliminarían el parásito menos efectivamente, representado menos riesgo a la preñez, y favorecería la infección congénita (Quinn *et al.*, 2002).

La infección fetal se atribuye a la reactivación de infección latente de *N. caninum* y es acompañada por una estimulación subsecuente/concurrente de respuesta inmune tipo 1 (*i.e.* IgG₂, IFN- α) al parásito (Andrianarivo *et al.*, 2005). Kobayashi *et al.* (2002) no observaron

reactivación de la infección por *N. caninum* en ratones hembra que recibieron hormonas esteroideas, aun así la preñez es un fenómeno complejo y el uso de hormonas solas no representa el ambiente fisiológico existente en la preñez, dificultándose la aseveración de un efecto hormonal nulo.

En la mayoría de los terneros neonatos infectados se evidencia una respuesta dominante de IgG₁. Las novillas infectadas naturalmente transmiten *N. caninum* a su

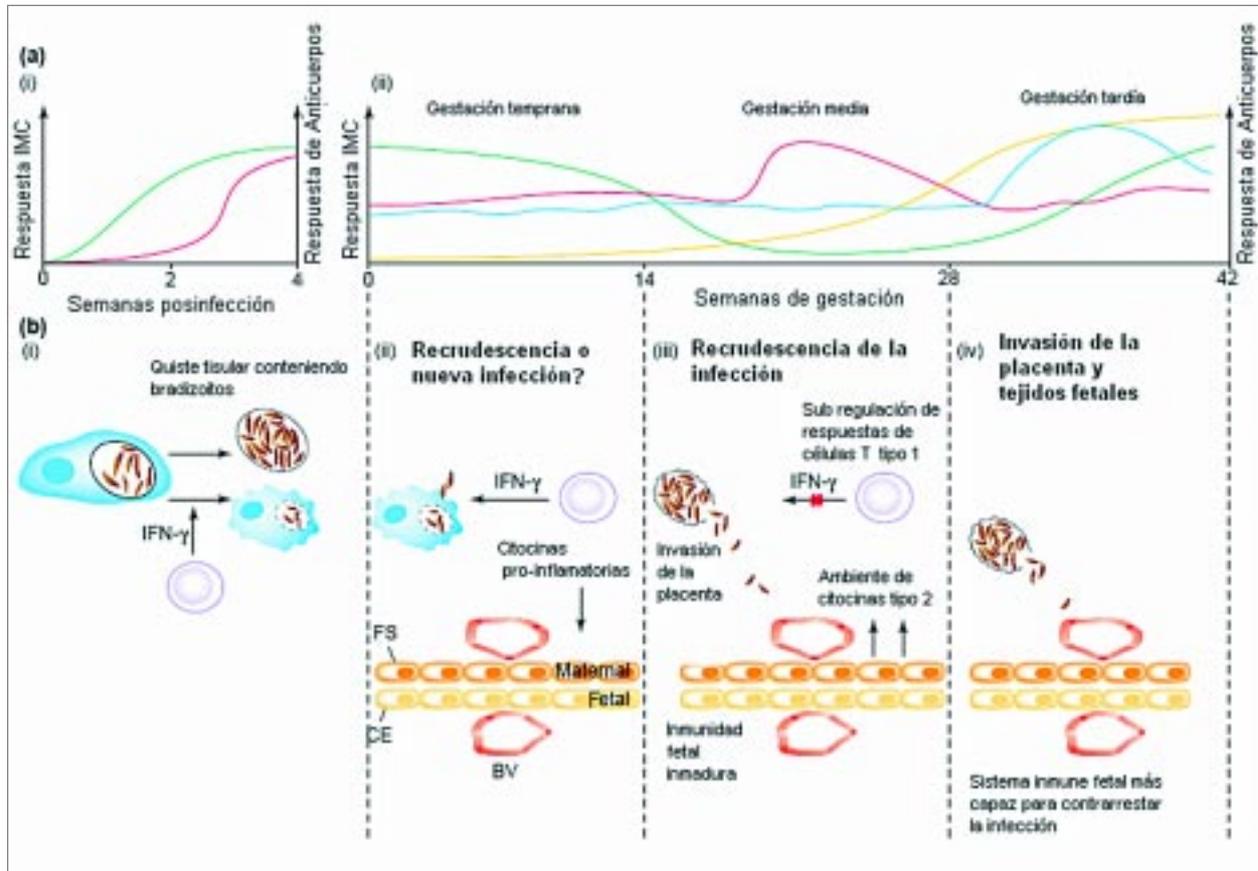


Figura 1. Aspectos de la relación huésped-parásito

La figura 1 ilustra los diferentes aspectos de la relación huésped-parásito en ganado no gestante y gestante. La figura 1ai muestra el desarrollo de la inmunidad mediada por células (IMC) (verde), involucrando la proliferación celular y producción de IFN- α , y respuestas de los anticuerpos (rojo) siguiendo la infección experimental de animales no gestantes con *N. caninum*. En animales no gestantes, la infección con *N. caninum* usualmente no causa enfermedad clínica. El IFN- α producido por células T CD4+ (púrpura) es capaz de limitar la multiplicación de parásitos intracelulares y es un importante componente de la inmunidad protectora (Fig. 1bi). La figura 1aii muestra la magnitud relativa de las respuestas IMC específicas (verde) a *N. caninum* y diferentes ejemplos de respuestas a anticuerpos a través de toda la gestación en ganado, donde la parasitemia ocurre a la mitad de la gestación (rojo) o en la gestación tardía (azul). La madurez relativa de la respuesta inmune fetal está indicada en amarillo. La causa de aborto en la gestación temprana es causada por la presencia de citocinas pro-inflamatorias de células T colaboradoras tipo 1 en la interfase materno-fetal (Fig. 1bii). Una significativa inmunomodulación de la proliferación celular y respuesta de IFN- α ocurre a la mitad de la gestación lo cual puede ser un desencadenante para la recrudescencia de la infección debido a la exquistación de los parásitos contenidos dentro de los quistes tisulares (Fig. 1biii). El ambiente de citocinas tipo 2 en la interfase materno-fetal favorecería la invasión del parásito de la placenta y la infección del feto. A este momento de la gestación, las consecuencias de la infección pueden ser la muerte del feto o el nacimiento de animales congénitamente infectados y presencia de signos al nacimiento, principalmente nerviosos. La transmisión vertical del parásito al feto en la gestación tardía es menos probable de resultar en aborto, presumiblemente debido a la madurez relativa del sistema inmune fetal (Fig. 1biv). (Modificado de Innes *et al.*, 2002)

progenie independiente de su estado de inmunización (Andrianarivo *et al.*, 2005). Pfeiffer *et al.* (2002) y Osawa *et al.* (2002) demostraron que no existe relación directa entre la seropositividad a *N. caninum* y la incidencia de aborto, debido a que existe variación en la habilidad del animal para responder inmunológicamente a la infección, además, dicha respuesta por parte del hospedero es dependiente de la carga de taquizoitos. Se ha sugerido que el ganado es capaz de adquirir un grado de inmunidad protectora contra el aborto, sin embargo, esta inmunidad desarrollada es insuficiente para prevenir completamente la transmisión vertical del parásito (Innes *et al.*, 2002).

Neospora y sus antígenos

Howe *et al.* (1998) aislaron dos proteínas inmunodominantes (*i.e.* altamente inmunogénicas) y altamente conservadas en la superficie de la membrana celular (p29 y p35; probablemente adhesinas) de *N. caninum*, las cuales son homólogas a las halladas en

T. gondii, y a las que le han sido adscritas funciones importantes tales como facilitar la adhesión del parásito a las células del hospedero así como brindar protección contra la respuesta inmune bactericida, debido a la inducción de inmunosupresión. Debido a su carácter altamente conservado (en términos filogenéticos) parecen haber evolucionado para modular la respuesta inmune del hospedero. Aun así, *N. caninum* posee menos complejidad en sus antígenos comparada con *T. gondii*, lo cual disminuye su patogenicidad y limita el rango relativo de hospederos (Howe *et al.*, 1998).

Otras proteínas tales como la NcMIC1 están implicadas en la adhesión del parásito a las células del hospedero así como en la invasión, constituyéndose en una candidato para la elaboración de vacunas (Aleadine *et al.*, 2005).

Trabajos de Uchida *et al.* (2004) revelaron la existencia de un antígeno de 73kDa el cual hace parte de los antígenos de superficie de los taquizoitos de *N. caninum* y que podría tener un papel importante en la invasión de las células del hospedero.

PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN

Previo a la implementación de una vacuna contra neosporosis bovina en Colombia, se deben efectuar estudios tanto exhaustivos como confiables de seroprevalencia en nuestras ganaderías. La evaluación por medio de serología, mediante detección de anticuerpos en animales no vacunados se sugiere como la herramienta diagnóstica, lo cual permita conocer el papel de la neosporosis bovina en la mortalidad embrionaria y así evaluar de manera certera su impacto económico.

La identificación de proteínas inmunodominantes (*e.g.* p29, p35) es una herramienta diagnóstica y

epidemiológica que permiten desarrollar estrategias de control y diagnóstico apropiado de la neosporosis bovina y pueden constituir el inicio de la búsqueda de estrategias tendientes a minimizar el impacto de esta enfermedad en el país.

Björkman *et al.* (2005) validaron el uso del patrón de avididad de IgG para evaluar la duración de la infección por *N. caninum* siguiente a la ingestión de ooquistes. Esta herramienta permite analizar epidemiológicamente la prevalencia de la enfermedad en una zona determinada y sería una opción a implementar en la ganadería colombiana.

CONCLUSIONES

La neosporosis bovina es una de las principales causas de pérdidas económicas en ganaderías de carne y leche. Su agente etiológico, *Neospora caninum*, produce aborto o nacimiento de terneros clínicamente sanos pero persistentemente infectados, dependiendo del momento gestacional en el cual el animal adquiere la infección. En animales no gestantes infectados con *N. caninum*, el IFN γ evita la multiplicación de los bradizoítos. En animales infectados en el primer tercio de la gestación, la madre genera una fuerte respuesta inflamatoria en la interfase materno-fetal (caracterizada por citoquinas de células Th1), conduciendo a la muerte embrionaria. Una infección a partir del segundo trimestre de gestación, desencadena una significativa inmunomodulación de la proliferación celular y

respuesta de IFN- α en un ambiente de citoquinas tipo 2, lo cual resulta en una muerte fetal o nacimiento de terneros persistentemente infectados, en ocasiones con signos neurológicos. Durante el tercer trimestre de la gestación, la inmunocompetencia fetal reduce la probabilidad de aborto, sin embargo, los terneros nacen clínicamente sanos pero persistentemente infectados.

El establecimiento del papel real de la neosporosis en el aborto bovino en la ganadería colombiana así como la identificación de antígenos inmunodominantes y estudios serológicos se consideran como estrategias candidatas para el control, mediante la implementación de inmunoprofilaxis (*e.g.* vacunas, entre otras).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alaeddine F, Keller N, Leepin A, Hemphill A. Reduced infection and protection from clinical signs of cerebral neosporosis in C57BL/6 mice vaccinated with recombinant microneme antigen NCMIC1. *J. Parasitol.* 2005. 91(3): 657-665.
- Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, Dubey JP, Hoffman RL, Conrad PA. Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 198(2): 241-4.
- Andrianarivo AG, Anderson ML, Rowe JD, Gardner IA, Reynolds JP, Choromanski L, Conrad PA. Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization. *Parasitol. Res.* 2005. 96: 24-31.
- Bjerkås, I., Mohn, SF, Presthus, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkd.* 1984. 70: 271-274.
- Björkman C, Gondim LFP, Näslund K, Trees AJ, McAllister MM. IgG avidity pattern in cattle after ingestion of *Neospora caninum* oocysts. *Vet. Parasitol.* 2005. 128: 195-200.
- Dubey JP, Hattel AI, Lindsay DS, Topper MJ. Neonatal *Neospora caninum* in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J Am Vet Assoc* 1988a; 193(10): 1259-63.
- Dubey, J.; Carpenter, J.; Speer, C.; Topper, M.; Uggla, A. Newly recognized fetal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1988b.192: 1269-1285.
- Dubey JP, Hartley WJ, Lindsay DS. Congenital *Neospora caninum* infection in a calf with spinal cord anomaly. *J Am Vet Med Assoc* 1990. 197(8): 1043-1044.
- Dubey J, Dorough K, Jenkins M, Liddell S, Speer C, Kwok C, Shen S. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. *Int. J. Parasitol.* 1998. 28: 1293-1304.
- García-Vázquez Z, Cruz-Vázquez C, Medina-Espinoza L, García-Tapia D, Chavarria-Martinez B. Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, México. 2002. *Vet. Parasitol.* 106: 115-120.
- Gondim LFP, Sartor IF, Hasegawa M, Yamane I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Vet. Parasitol.* 1999. 86: 71-75.
- Heydorn AO, Mehlhorn, H. *Neospora caninum* is an invalid species name: an evaluation of facts and statements. *Parasitol. Res.* 2002. 88: 175-184.
- Howe DK, Crawford AC, Lindsay D, Sibley LD. The p29 and p35 Immunodominant Antigens of *Neospora caninum* Tachyzoites Are Homologous to the Family of Surface Antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 1998. 66 (11): 5322-5328.
- Innes EA, Andrianarivo AG, Björkman C, Williams DJL, Conrad PA. Immune response to *Neospora caninum* and prospect for vaccination. *Trends Parasitol.* 2002. 18(11): 497-504.
- Innes EA, Wright S, Bartley P, Maley S, Macaldowie C, Esteban-Redondo I, Buxton D. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2005. 108: 29-36.
- Kobayashi A, Katagiri S, Kimura T, Ochiai K, Umemura T, Steroid hormones do not reactivate *Neospora caninum* in ovariectomized mice. *J. Vet. Med. Sci.* 2002. 64: 773-777.
- Koiwai M, Hamaoka T, Haritani M, Shimizu S, Tsutsui T, Eto M, Yamane I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle with reproductive disorders in Japan. *Vet. Parasitol.* 2005. 130: 15-18.
- Lunden A, Wright S, Allen JE, Buxton D. Immunisation of mice against neosporosis, *Int. J. Parasitol.* 2002. 32: 867-876.
- Maley SW, Buxton D, Rae AG, Wright SE, Schock A, Bartley PM, Esteban-Redondo I, Swales, Hamilton, Sales J, Innes EA. The Pathogenesis of Neosporosis in Pregnant Cattle: Inoculation at Mid-gestation. *J. Comp. Path.* 2003. 129: 186-195.
- McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* 1998. 28:1473-1478.
- Mehlhorn H, Heydorn AO. *Neospora caninum*: Is it really different from *Hammondia heydorni* or is it a strain of *Toxoplasma gondii*? An opinion. *Parasitol. Res.* 2000. 86: 169-178.
- Moore DP, Draghi MG, Campero CM, Cetrá B, Odeón AC, Alcaraz E, Späth EAJ. Serological evidence of *Neospora caninum* infections in beef bulls in six counties of the Corrientes province, Argentina. *Vet. Parasitol.* 2003. 114: 247-252.
- Moore DP, Leunda MR, Zamorano PI, Odeón AC, Romera SA, Cano A, Yaniz G, Venturini MC, Campero CM. Immune response to *Neospora caninum* in naturally infected heifers and heifers vaccinated with inactivated antigen during the second trimester of gestation. *Vet. Parasitol.* 2005. 130: 29-39.

- Murray HW, Juangbhanich CW, Nathan CF, Cohn ZA. 1979. *J. Exp. Med.* 150: 950–964. Citado por: Yamane I, Kitani H, Kokuho T, Shibahara T, Haritani M, *et al.* The inhibitory effect of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha on intracellular multiplication of *Neospora caninum* in primary bovine brain cells. *J. Vet. Med. Sci.* 2000. 62(3): 347-351.
- Nishikawa Y, Tragoopua K, Inoue N, Makala L, Nagasawa H, Otsuka H, Mikami T. In the Absence of Endogenous Gamma Interferon, Mice Acutely Infected with *Neospora caninum* Succumb to a Lethal Immune Response Characterized by Inactivation of Peritoneal Macrophages. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001. 8 (4): 811–817.
- Orrego JC. Citoquinas. In: Rugeles MT, Patino PJ. Edits. *Inmunología: Una ciencia active.* Tomo I. Fondo Editorial Biogénesis, Colombia. 2004. p. 333.
- Osawa T, Wastling J, Acosta L, Ortellado C, Ibarra J, Innes E. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Paraguay. *Vet. Parasitol.* 2002. 110: 17–23.
- Pérez-Zaballos FJ, Ortega-Mora LM, Alvarez-Garcia G, Collantes-Fernandez E, Navarro-Lozano V, García-Villada L, Costas E. Adaptation Of *Neospora Caninum* Isolates To Cell-Culture Changes: An Argument In Favor Of Its Clonal Population Structure. *J. Parasitol.* 2005. 91(3): 507-510.
- Pfeiffer DU, Williamson NB, Reichel MP, Wichtel JJ, Teague WR. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on a dairy farm in New Zealand. *Preventive Vet. Med.* 2002. 54: 11–24.
- Quinn HE, Ellis JT, Smith NC. *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy?. *Trends Parasitol.* 2002. 18: 391–394.
- Quintanilla-Gozalo A, Pereira-Bueno J, Tabarés E, Innes EA, González-Paniello R, Ortega-Mora LM. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. *Int. J. Parasitol.* 1999. 29: 1201-1208.
- Rettigner C, Leclipteux T, De Meerschman F, Focant C, Losson B. Survival, immune responses and tissue cyst production in outbred (Swiss white) and inbred (CBA/Ca) strains of mice experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *Vet. Res.* 2004. 35: 225–232.
- Sadrebazzaz A, Haddadzadeh, H, Esmailnia K, Habibi G, Vojgani M, Hashemifesharaki R. Serological prevalence of *Neospora caninum* in healthy and aborted dairy cattle in Mashhad, Iran. *Vet. Parasitol.* 2004. 124: 201–204
- Suteeraparp P, Pholpark S, Pholpark M, Charoenchai A, Chompoochan T, Yamane I, Kashiwazaki Y. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and associated abortion in dairy cattle from central Thailand. *Vet. Parasitol.* 1999. 86: 49–57
- Tanaka T, Hamada T, Inoue N, Nagasawa H, Fujisaki K, Suzuki N, Mikami T. The role of CD4+ or CD8+ T cells in the protective immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum* infection. *Vet. Parasitol.* 2000b. 90:183–191.
- Tanaka T, Nagasawa H, Fujisaki K, Suzuki N, Mikami T. Growth-inhibitory effects of interferon-gamma on *Neospora caninum* in murine macrophages by a nitric oxide mechanism. *Parasitol. Res.* 2000a. 86: 768–771.
- Thilsted JP, Dubey JP. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J Vet Diagn Invest* 1989. 3: 205-9.
- Thornton RN, Thompson EJ, Dubey JP. *Neospora* abortion in New Zealand cattle. *N Z Vet J* 1991; 39 (4): 129-3.
- Tizard I. MHC: receptores presentadores de antígeno. Capítulo 6 & Linfocitos B y su reacción al antígeno. Capítulo 11. In: Tizard I. *Inmunología Veterinaria.* Sexta Edición. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. 2002. p. 54, 122.
- Uchida Y, Ike K, Kurotaki, T, Ito A, Imai S. Monoclonal antibodies preventing invasión of *Neospora caninum* tachyzoites into host cells. *J. Vet. Med. Sci.* 2004. 66(11): 1355-1358.
- Václavek P, Koudela B, Modrý B, Sedlák K. Seroprevalence of *Neospora caninum* in aborting dairy cattle in the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 2003. 115: 239–245.
- Woodman JP, Dimier IH, Bout DT. 1991. *J. Immunol.* 147: 2019–2023. Citado por: Yamane I, Kitani H, Kokuho T, Shibahara T, Haritani M, *et al.* The inhibitory effect of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha on intracellular multiplication of *Neospora caninum* in primary bovine brain cells. *J. Vet. Med. Sci.* 2000. 62(3): 347-351.
- Yamane I, Kitani H, Kokuho T, Shibahara T, Haritani M, *et al.* The inhibitory effect of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha on intracellular multiplication of *Neospora caninum* in primary bovine brain cells. *J. Vet. Med. Sci.* 2000. 62(3): 347-351.